

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-276996

(43)Date of publication of application : 26.10.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C07H 21/04  
C12N 15/11  
C12Q 1/04  
// (C12Q 1/04  
C12R 1:63 )

(21)Application number : 04-079800

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 01.04.1992

(72)Inventor : HONDA TAKESHI  
YAMAMOTO KOICHIRO  
YO AKIYORI  
TAKARADA YUTAKA  
SHIBATA HIDEJI

(54) OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING VIBRIO CHOLERAEE TOXIN, METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING VIBRIO CHOLERAEE TOXIN AND REAGENT KIT FOR DETECTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an oligonucleotide useful for directly, simply, rapidly and specifically detecting Vibrio cholerae capable of producing Vibrio cholerae toxin with high sensitivity.

CONSTITUTION: The objective oligonucleotide for detecting Vibrio cholerae capable of producing Vibrio cholerae toxin has a nucleic acid sequence expressed by sequence Nos.1 to 6 in a sequence table or a sequence complementary thereto. The objective method for detecting the microorganism capable of producing the Vibrio cholerae toxin in a sample and the objective reagent kit for detection using a labeled oligonucleotide prepared by labeling the oligonucleotide and the oligonucleotide as a probe or a primer are obtained.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-276996

(43)公開日 平成5年(1993)10月26日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	8114-4B		
C 0 7 H 21/04	B			
C 1 2 N 15/11				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-79800

(22)出願日 平成4年(1992)4月1日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 本田 武司

大阪府茨木市西中条町3-29

(72)発明者 山本 耕一郎

滋賀県草津市矢橋町39-23

(72)発明者 余 明順

京都市北区紫竹桃ノ本町28-3

(72)発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチド、コレラ毒素産生菌の検出法及び検出用試薬キット

(57)【要約】

【目的】 直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なコレラ毒素産生性コレラ菌の検出に用いるオリゴヌクレオチドを提供する。

【構成】 配列表・配列番号1～6に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するコレラ毒素産生性コレラ菌検出用オリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを標識化した標識化オリゴヌクレオチドおよびこれらのオリゴヌクレオチドをプローブあるいはプライマーとして使用する試料中のコレラ毒素産生菌の検出法および検出用試薬キット。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列表・配列番号1～6（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されてもよい。）に示す核酸配列を有するか、またはそれらの相補的配列を有するコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 請求項1に記載のコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化したコレラ毒素産生菌検出用標識オリゴヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1に記載のコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することを特徴とする試料中のコレラ毒素産生菌の検出法。

【請求項4】 請求項1のコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするかまたは標識化して得られた標識核酸プライマーを、試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマー伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することを特徴とする試料中のコレラ毒素産生菌の検出法。

【請求項5】 請求項1のコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化した標識核酸プローブを含むことを特徴とする試料中のコレラ毒素産生菌の検出用試薬キット。

【請求項6】 請求項1のコレラ毒素産生菌検出用オリゴヌクレオチドをそのままプライマーとするか、または標識化して得られた標識核酸プローブを含むことを特徴とする試料中のコレラ毒素産生菌の増幅及び／または検出用試薬キット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明はコレラ毒素産生菌、具体的にはビブリオ・コレラ（*Vibrio cholerae*）中でコレラ毒素を産生する菌を簡便かつ迅速に検出することに関する。

**【0002】**

【従来の技術】 コレラ菌は飲食物を介して経口感染によりコレラを起こす法定伝染病原菌である。発展途上国では大規模な流行を示し、患者は嘔吐と大量の下痢のため脱水症状が強くなりショック状態に陥り、死に至ることも多い。しかし、生化学的性状で分類されるコレラ菌の中にはコレラ毒素を産生せず、病原性を示さないコレラ菌もあり、コレラ毒素産生性の判定が重要である。従ってコレラ毒素産生性コレラ菌の検出、同定は食品産業、公衆衛生、臨床検査分野に於て重要であり、且つコレラが法定伝染病であるという性格上迅速な測定が望まれている。しかし、コレラ毒素産生コレラ菌とコレラ毒素非産生コレラ菌は血清学的にも生化学的にも全く区別は出来ない。そこでコレラ毒素そのものの産生性を見る

必要がある。従来からコレラ毒素の産生性を検出する方法としては、De test（ウサギの腸管を結紮し、その中に菌液を接種する方法）、Duttatest（乳飲みウサギに経口的に菌液を投与しコレラ症状を起こす方法）などの生物学的検出法があるが、手技が複雑で簡便な検査とは言えない。コレラ菌は一般に抗血清との反応性による同定がなされている。これはO抗原と呼ばれる細菌表面の糖鎖抗原による分類である。コレラ菌には稲葉型抗原、小川型抗原という2つの抗原があり、それぞれに特異な抗血清を作ることができる。このコレラ菌に特異的な抗原をまとめてO1抗原と言う。コレラ菌（*Vibrio cholerae*）中でこの抗O1血清と免疫反応を起こす菌がコレラ菌として分類されている。一方この抗O1血清と免疫反応を起こさない、血清学的に性状の異なる非O1型コレラ菌（*Vibrio cholerae* non O1: ナグビブリオと呼ばれることがある）も存在し、これらの中にはコレラ毒素とほとんど同じ毒素を産生し、食中毒の原因菌となるものもある。従ってこれらの毒素を産生するナグビブリオの判定も重要である。またポリミキシンB感受性やニワトリ赤血球凝集反応などによりアジア型コレラ菌とエルトルコレラ菌に分類され、現在ではエルトルコレラ菌が主流を占めている。更にファージ型分類、免疫学的分類などもあるが、これらはコレラ毒素産生性とは直接関係がない。近年、DNAプローブを初めとする遺伝子検査による細菌の同定や毒素遺伝子の検出が多くなされている。コレラ毒素の遺伝子配列は明かにされているが、コレラ毒素は毒素原性大腸菌の易熱性毒素（Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: ETEC-LT）との類似性が高く、遺伝子レベルでの類似性も高いことが知られており、DNAプローブでの分別も困難である。更にこのETEC-LT毒素による腸管感染症では症状がコレラと非常に類似しており臨床症状からの鑑別は困難であるため、正確な検査法が待ち望まれている。

**【0003】**

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明の目的は直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なコレラ毒素産生性コレラ菌の検出に用いるオリゴヌクレオチドを提供することである。

**【0004】**

【課題を解決するための手段】 本発明者はコレラ毒素の遺伝子に関する種々の検討を重ねた結果、ETEC-LTなど類似の毒素とも反応しない特異性の高い、高感度かつ簡便、迅速に診断可能なオリゴヌクレオチドを得、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。

【0005】 すなわち、本発明はコレラ毒素産生性コレラ菌に特異的なオリゴヌクレオチド、配列表・配列番号1～6（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラ

シル(U)と置換されてもよい。)に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するコレラ毒素産生性コレラ菌検出用オリゴヌクレオチドおよび該オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチドである。本発明は該コレラ毒素産生性コレラ菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することを特徴とする試料中のコレラ毒素産生性コレラ菌の検出法、または該コレラ毒素産生性コレラ菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするか、または標識化して得られた標識プライマーを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマーを伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することを特徴とする試料中のコレラ毒素産生性コレラ菌の検出法である。さらに本発明はプローブとして該オリゴヌクレオチドを含むコレラ毒素産生菌検出用試薬キットおよびプライマーとして該オリゴヌクレオチドまたは標識オリゴヌクレオチドを含むコレラ毒素産生菌検出用試薬キットである。

【0006】本発明のオリゴヌクレオチドは化学合成により調製できるので、クローン化したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに比べ容易、大量且つ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。本発明のオリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸(DNA)でもリボ核酸(RNA)でもよい。リボ核酸の場合はチミジン残基(T)をウリジン残基(U)と読み替えることは言うまでもない。また合成に際して任意の位置のTをUに変えて合成を行ない、ウリジン残基を含むDNAであってもよい。同様に任意の位置のUをTに変えたチミジン残基を含むRNAであってもよい。またオリゴヌクレオチド中に欠失、挿入あるいは置換といった点突然変異や、修飾ヌクレオチドがあってもよい。オリゴヌクレオチドに抗原、ハプテン、酵素、蛍光物質、発光物質、酵素基質、放射性物質、不溶性担体などの標識物質を導入することにより標識オリゴヌクレオチドを得る。標識結合法は通常の方法に従う。たとえばリンカーアームを有するヌクレオチドを配列表・配列番号1のオリゴヌクレオチドの一員として置換することにより酵素を標識化することができる(Nucleic Acids Research, 14, 6115, 1986 など)。その一例として5位にリンカーアームを有するウリジンを特表昭60-500717号公報に記載される合成法によりデオキシウリジンから化学合成し、蒸気ヌクレオチドへ導入することもできる。標識の仕方は末端標識でも、配列の途中に標識してもよい。また糖、リン酸基、塩基部分への標識であってもよい。

【0007】本発明のオリゴヌクレオチドを用いて試料中のコレラ毒素産生性コレラ菌を検出する場合、(1)オリゴヌクレオチドをプローブとして試料中のDNAま

反応液組成

たはRNAと交雑させ、交雑物を検出する方法、または(2)オリゴヌクレオチドをプライマーとして試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、DNAポリメラーゼ等により伸長反応を行い、得られた伸長物から目的核酸を検出する方法がある。これらの場合、上述のようにオリゴヌクレオチドに抗原、ハプテン、酵素、蛍光物質、発光物質、酵素基質、放射性物質、不溶性担体などの標識を導入することにより容易に検出が可能となる。標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合、試料とのハイブリダイゼーション後に上記のような標識を適当な検出法で検出することで試料中のコレラ毒素産生性コレラ菌を検出できる。オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、DNAポリメラーゼ等による遺伝子増幅(PCR; 特開昭62-281号公報参照)を行なうことによりコレラ毒素遺伝子のみを特異的に増幅することができる。PCRに際しては反応時に放射性標識ヌクレオチドを取り込ませる方法や、増幅産物を電気泳動により分画して特異なバンドを検出することで容易にコレラ毒素遺伝子の存在、すなわちコレラ毒素産生性コレラ菌を検出することができる。また前述の標識オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いれば増幅産物を直接検出することも可能である。

【0008】本発明のオリゴヌクレオチドを固相担体に結合して、捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと標識プローブの組合せでサンドイッチアッセイを行ってもよいし、標的核酸を標識して捕捉する方法もある。またオリゴヌクレオチドをビオチンで標識し、ハイブリダイゼーション後アビジン結合担体で捕捉する方法もある。サンドイッチアッセイにおいてはどちらか一方に本発明のオリゴヌクレオチドを用いれば、オリゴヌクレオチドにより特異的な測定が可能となり、他方のオリゴヌクレオチドの特異性は若干低くてもなんら問題はない。

【0009】

【実施例】次に本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1 各種オリゴヌクレオチドの合成

ABI社DNAシンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて配列表・配列番号2~6に示される配列を有するオリゴヌクレオチドを各種合成した。以下、配列表・配列番号2~6に示される各種オリゴヌクレオチドをそれぞれオリゴヌクレオチド(2)~(6)と呼ぶ。手法はABI社マニュアルに従い、0.2 μmolスケールで実施した。各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃一夜実施した。精製はファルマシア社製FPLCで逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴヌクレオチドは必要により以下の方法で5'末端に<sup>32</sup>P-リン酸基を結合させた。

オリゴヌクレオチド	5 ~ 20pmoles
10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 $\mu$ l
1mM [ $\gamma$ - <sup>32</sup> PATP(10mCi/ml)]	1 $\mu$ l
T4ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡製)	10 単位
水	全量が 100 $\mu$ l となる量

上記のように調製した反応混合液を37°Cで1時間反応させた。ここで10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液とは、0.5M Tris-HCl(pH8.0)、0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.1M2-メルカプトエタノールを示す。

#### 【0010】実施例2

(1) コレラ毒素産生コレラ菌由来核酸を増幅するための試薬キット

- (a) 実施例1のオリゴヌクレオチド(3)
- (b) 実施例1のオリゴヌクレオチド(4)
- (c) 実施例1のオリゴヌクレオチド(5)
- (d) 実施例1のオリゴヌクレオチド(6)
- (e) Tth DNA ポリメラーゼ (東洋紡製)、dATP、dCTP、dGTP、dTTP

#### (2) 検体の調製

コレラ患者から糞便試料を採取し、PBS に懸濁し、15,000rpm、10分間遠心分離した後、200  $\mu$ l の水を加え煮沸することにより核酸を抽出した。コレラ毒素産生コレラ菌の標準株としVibrio Cholerae 569B株を培養し同様に処理し検体として用いた。

#### (3) PCR

反応液90  $\mu$ l に上記核酸溶液10  $\mu$ l、実施例1のオリゴヌクレオチド各 5  $\mu$ lずつをプライマーとして加え、コレラ毒素産生コレラ菌由来核酸の増幅を行った。反応液組成は1mM ジチオスレイトール、50mM KCl、10mM Tris-HCl(pH8.3)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%(wt/vol)ゼラチン、それぞれ0.2mM のdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびTth DNAポリメラーゼ40単位/mlである。反応条件は次の通りである。はじめに94°C 5分の変性処理を行った後、

熱変性： 94°C、1分、

アニーリング：58°C、2分

重合反応： 75°C、1.5 分

を30回繰り返した。これらの操作はパーキン・エルマー/シータス(Perkin-Elmer/Cetus)社のDNAサーマルサイクラーを用いて行った。

#### 【0011】(4) 検出

10  $\mu$ l の反応液を 2%アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した後、紫外線での蛍光を検出した。泳動の電気的條件は、定電圧100V、時間は30分を行った。操作方法並びに他の条件はManiatisらのMolecular Cloning(1982)に記載の方法に従った。反応液の他に分

子量マーカも同時に泳動し、相対泳動度の比較により、検出されたヌクレオチド断片の長さを算出した。

#### (5) 結果

患者より得られた検体のPCR産物はプライマー(3)(4)の組合せでは 372塩基、プライマー(5)(6)の組合せでは 318塩基を示し、コレラ毒素産生コレラ菌標準株と同じヌクレオチド長を有していた。これは国内分離株の核酸配列から計算されるヌクレオチドの長さとはよく一致した(表1)。

#### 【0012】

【表1】

検体	プライマー	
	A (3) + (4)	B (5) + (6)
患者 1	3 7 2	3 1 8
2	3 7 2	3 1 8
3	3 7 2	3 1 8
4	3 7 2	3 1 8
標準株	3 7 2	3 1 8

#### 【0013】参考例1

試薬キットの特異性の確認

実施例2の結果がコレラ毒素産生コレラ菌に特異であることを確認するために他の細菌についても実施例2と同様の操作を行なった。他の細菌には下記表2の菌を用いた。結果は表2のごとくコレラ毒素産生コレラ菌及びコレラ毒素を産生することが確認されているナグビブリオ、ビブリオミミカス以外には増幅バンドは見られなかった。

#### 【0014】

【表2】

核酸の由来	結果
ヒト胎盤	—
腸炎ビブリオ (TDH, TRH非産生株)	—
腸炎ビブリオ (TDH産生株)	—
腸炎ビブリオ (TRH産生株)	—
コレラ菌 (コレラ毒素産生株)	+
コレラ菌 (コレラ毒素非産生株)	—
ナグビブリオ (コレラ様毒素遺伝子陽性)	+
ナグビブリオ (コレラ様毒素遺伝子陰性)	—
ビブリオ・ミミカス (コレラ様毒素遺伝子陽性)	+
ビブリオ・ミミカス (コレラ様毒素遺伝子陰性)	—
毒素原性大腸菌 (易熱性毒素産生)	—
毒素原性大腸菌 (耐熱性毒素産生)	—

## 【0015】実施例3

コレラ毒素産生コレラ菌核酸検出用プローブとして、5'末端に、 $^{32}\text{P}$ -リン酸基を有している核酸を含む実施例1のオリゴヌクレオチド(2)を調製した。

## 【0016】(1)オリゴヌクレオチドの合成

リンカーアームを有するコレラ毒素産生性コレラ菌検出用のオリゴヌクレオチドをDNA合成機 380A 型 (アプライド バイオシステムズ社) を用いて、ホスホアミダイト法により合成した。

塩基配列は以下のとおりである。

5'-AATAGGGGCTACAGAGAXAGATATTACAGT-3'

該配列中、Xは5位にリンカーアームを有するウリジンをしめす。この配列は配列表・配列番号1の配列の一部のT部分をXに置換したものである。この5位にリンカーアームを有するウリジンは、特表昭 60-500717号公報に記載された合成法によりデオキシウリジンから化学合成により調製しオリゴヌクレオチドに導入した。合成されたオリゴヌクレオチドは27%アンモニア水で55°C、4時間脱保護処理を施した後、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーMono-Q FPLC (ファルマシア社) を用いて精製した。0.2  $\mu\text{mol}$  スケールの合成を行ない、約1.5 A260 (260nm における吸光度より求めた絶対量) のオリゴヌクレオチドを得た。

## 【0017】(2) 標識オリゴヌクレオチドの合成

上記リンカーオリゴヌクレオチドと、そのリンカーアームを介してのアルカリ性ホスファターゼとの結合を、文献 (Nucleic Acids Research, 14, 6115, 1986) に従って行なった。リンカーオリゴヌクレオチド 1.0 A260 を 0.2 M  $\text{NaHCO}_3$  60  $\mu\text{l}$  に溶解し、ここへスベリン酸ジスクシニミジル (DSS) 1.25mgを加えて室温、2分間反応させた。反応液を 1mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH5.0) で平衡化したSephadex G-25 カラム (1cm $\phi$  x 30cm) でゲル濾過して過剰のDSSを除去した。末端のアミノ基が活性化されたリンカーオリゴヌクレオチドを、更にモル比で2倍等量のアルカリ性ホスファターゼ (ペーリンガー・マンハイム社) (10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 3M NaCl に溶解したもの) と室温、16時間反応させることでアルカリ性ホスファターゼ標識核酸プローブを得た。得られた標識プローブは、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーMono-Q FPLC (ファルマシア社) を用いて精製した。標識プローブを含む画分を集め、セントリコン30K (アミコン社) を用いて限外濾過法により濃縮した。

## 【0018】(3) アルカリ性ホスファターゼ標識核酸プローブの検討

この検討には、既に逆受身赤血球凝集反応 (RP LA) 法、ELISA 法により毒素産生性が同定されているコレラ菌株 109株 (臨床分離株88株、環境分離株21株) を用いた。各菌株をアルカリ性ペプトン水 (pH8.4) に接種し、

37℃で一晩回転培養した。各菌液 2μl づつをナイロン膜に滴下し、アルカリ条件で溶菌、ナイロン膜に核酸を固定した。この膜を中和後ハイブリダイゼーションバック (BRL社) に膜を移し、25μl のアルカリ性ホスファターゼ標識核酸プローブ液を含むハイブリダイゼーションバッファー (5xSSC, 0.5% ウシ血清アルブミン、0.5% ポリビニールピロリドン、1% ドデシル硫酸ナトリウム) 5ml を加えてポリシーラーでシールし 50℃15分間プレハイブリダイゼーションを行なった。膜をポリバッグから取り出し、洗浄液-1 (1xSSC, 1% ドデシル硫酸ナトリウム) で 50℃、5分間で 2回、振とう洗浄した。更に洗浄液-2 (1xSSC, 1% トリトン X-100) で 50℃、5分間で 2回、室

温 5分間で 2回振とう洗浄した。最後に洗浄液-3 (1xSSC) で室温 5分間で 2回振とう洗浄した。膜を新しいハイブリダイゼーションバックに移し、基質液 (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.1M MgCl<sub>2</sub>, 0.3mg/ml、ニトロブルーテトラゾリウム、0.3mg/ml プロムクロロインドフェリールホスフェート、pH7.5) を入れポリシーラーでシールし 37℃で 1時間インキュベートした。アルカリ性ホスファターゼにより生じる紫色色素のスポットを目視により判定した。

【0019】結果を下表に示す。

【0020】

【表3】

	R P L A または E L I S A	本 法		
		+	-	
臨床分離株	+	66	1	感 度 : 98.5%
	-	2	19	特異性 : 90.4%
環境分離株	+	4	0	感 度 : 100%
	-	0	17	特異性 : 100%

全体では感度 98.6%、特異性 94.7% と良好な結果を得た。

【0021】上記アルカリ性ホスファターゼ標識核酸プローブの特異性の特異性を下記菌に対して検討した。コレラ菌と同属のビブリオ属の菌と、コレラ菌と同様に下痢起炎菌となりうる細菌、ヒト胎盤由来の DNA を用いてクロスハイブリダイゼーションの有無を調べた。細菌は

全て臨床分離株を用い、適当な培地で増殖させ、実施例 8 と同様の方法で測定した。結果はコレラ菌及びコレラ毒素様毒素を産生することが確認されているナグビブリオ、ビブリオミミカスのみが陽性であった。以下に結果を示す。

【0022】

【表4】



核酸の由来	結果
ヒト胎盤	—
腸炎ビブリオ (TDH, TRH非産生株)	—
腸炎ビブリオ (TDH産生株)	—
腸炎ビブリオ (TRH産生株)	—
コレラ菌 (コレラ毒素産生株)	+
コレラ菌 (コレラ毒素非産生株)	—
ナグビブリオ (コレラ様毒素遺伝子陽性)	+
ナグビブリオ (コレラ様毒素遺伝子陰性)	—
ビブリオ・ミミカス (コレラ様毒素遺伝子陽性)	+
ビブリオ・ミミカス (コレラ様毒素遺伝子陰性)	—
毒素原性大腸菌 (易熱性毒素産生)	—
毒素原性大腸菌 (耐熱性毒素産生)	—

## 【0023】

【発明の効果】本発明によりコレラ毒素産生コレラ菌を迅速、簡便に特異的且つ高感度で測定することが可能となった。本発明のオリゴヌクレオチドは増幅反応のプライマーとしても、直接検出用のプローブとしても用いることが可能である。特に増幅反応では高い検出感度のため少量の検体からでもコレラ毒素産生コレラ菌を検出することが可能で、その臨床的意義は大きい。

## 【0024】

## 【配列表】

配列番号：1

## 配列

AATAGGGGCT ACAGAGATAGA TATTACAGT

30

## 【0025】配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

TATCTTACTG AAGCTAAAGT CGAAAAGTTA

30

## 【0026】配列番号：3

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..30

特徴を決定した方法：S

他の特徴：コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配列を有する。

配列の特徴

存在位置：1..30

特徴を決定した方法：S

他の特徴：コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配列を有する。

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..22

特徴を決定した方法 : S

他の特徴 : コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配

配列

GGTCAAATA TATTGTCTGG TC

22

【0027】配列番号 : 4

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ACTCATCGAT GATCTTGGAG C

21

【0028】配列番号 : 5

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCATATGCAC ATGGAACACC T

21

【0029】配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 両形態

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CATACTAATT GCGGCAATCG C

21

列を有する。

配列の特徴

存在位置 : 1..21

特徴を決定した方法 : S

他の特徴 : コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配列を有する。

配列の特徴

存在位置 : 1..21

特徴を決定した方法 : S

他の特徴 : コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配列を有する。

配列の特徴

存在位置 : 1..21

特徴を決定した方法 : S

他の特徴 : コレラ毒素産生コレラ菌の配列と相補的な配列を有する。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C 1 2 Q 1/04

C 1 2 R 1:63)

(72) 発明者 柴田 秀司

滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡

績株式会社総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**